

平成21年 5月 1日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007~2008  
 課題番号： 19590049  
 研究課題名 (和文) 機能性キャピラリー固相マイクロ抽出法に基づく薬毒物濃度と毒性の同時分析法の開発  
 研究課題名 (英文) Development of simultaneous analysis of drugs and their toxicity using a functional in-tube solid-phase microextraction technique  
 研究代表者  
 片岡 洋行 (KATAOKA HIROYUKI)  
 就実大学・薬学部・教授  
 研究者番号： 80127555

研究成果の概要：キャピラリーカラムやその内壁に機能性を持たせた分子認識キャピラリーを用いて、生体試料や食品・環境試料中の微量の薬毒物及び食品・環境汚染物質を効率的に抽出・濃縮する固相マイクロ抽出法を考案し、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)と連結したオンライン自動分析法を開発した。また、薬毒物代謝酵素(CYP)活性測定法を確立し、薬毒物や汚染物質の濃度と CYP 酵素阻害活性を指標とした毒性を同時に分析できるシステムを検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：固相マイクロ抽出 (SPME) 法、機能性キャピラリー、オンライン自動分析、薬毒物分析、環境汚染物質、食品汚染分析、マイコトキシン、皮膚ガス分析

## 1. 研究開始当初の背景

薬毒物の曝露による健康影響を評価するためには、化合物濃度だけでなくその量で安全かどうか、その毒性も同時に測定する必要がある。しかし、これまでの分析装置では高感度化や高速化、操作性の向上が図られてきたが、濃度と毒性を同時に評価できず、生体や環境中の複雑な試料から微量の化合物を抽出、濃縮、精製するための前処理技術の開発が遅れているため、効率的試料前処理法の実用化が重要な課題となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、生物機能を模倣した機能性キャピラリーを作製し、化合物濃度と毒性の同時評価システムを開発することを目的とし、以下の基礎的、応用的な研究を行った。

- (1) 分子インプリント (MIP) 法による機能性キャピラリーの作製とその性能評価
- (2) インチューブ固相マイクロ抽出 (SPME)/LC-MS 法による薬毒物及び食品・環境汚染物質分析法の開発
- (3) 薬毒物代謝活性阻害による毒性評価

### 3. 研究の方法

#### (1) 試薬及び試液

分析対象化合物は、純度の高い分析用標準物質を用いた。各標準物質は、メタノールに溶解して1 mg/mLとして保存し、精製水で適当な濃度に希釈して使用した。また、移動相溶媒には、LC-MS 用を、その他の試薬類は、すべて試薬特級品を用いた。

#### (2) 装置及び測定条件

装置は、Agilent 1100 シリーズ LC-MS システムを使用した。測定条件は、分析対象化合物に対して、様々な LC カラム及び移動相を用いて分離を検討し、MS 及び蛍光検出条件を最適化した。すべてのシステムの動作やプログラム、データ処理はケミステーションで行った。

#### (3) インチューブ SPME 法

図 1 に示すように、長さ 60 cm のキャピラリーカラムを 1/16 インチの PEEK チューブに通し、Supelco 製 1/16 インチの SS ユニオン (0.25  $\mu\text{m}$ ) とフェラルで固定して、オートサンプラーのインジェクションループとインジェクションニードルの間に取り付けた。インチューブ SPME は、バイパスポジションで計量ポンプによりメタノール吸入/吐出、空気吸入、蒸留水吸入/吐出、サンプル吸入/吐出 (40  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 20 サイクル)、メタノール吸入/吐出 (2  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) し、その後バルブをメインパスポジションに切り替えて注入モードとなるようプログラムした。インチューブ SPME 操作はすべて自動的に行えるが、まず試料溶液の入ったバイアルをオートサンプラーにセットし、インジェクションプログラムにより、計量ポンプでキャピラリー内をメタノール及び蒸留水で洗浄コンディショニングした後、試料溶液の吸入/吐出を繰り返し、キャピラリー内固定相へ化合物を吸着させる (図 1A)。次に、六方バルブを切り替えて移動相を流して化合物を脱離させ、移動相と共に HPLC カラムへ移送し、分離された化合物を MS または蛍光検出、データ解析する (図 1B)。

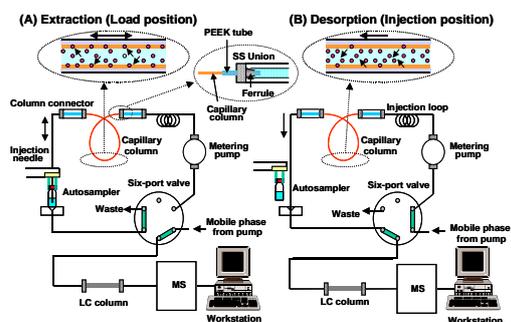


図 1 インチューブ SPME/LC-MS システム

#### (4) 分子認識キャピラリーの作製と性能評価

分析対象と構造の類似した化合物を鋳型として使い、機能性モノマー (メタクリル酸)、架橋剤 (エチレングリコールジメタクリレート) と共にクロロホルムに溶解し、重合開始剤 (2,2'-アゾビスイソブチロニトリル) を加えた後、この混合液を窒素加圧下でフロロカーボン糸 (65 cm  $\times$  0.205 mm) を通したヒューズドシリカキャピラリーカラム (60 cm  $\times$  0.32 mm, i. d.) 内に充填し、65°C の水浴中で 1 時間加熱重合した。糸を抜き取った後、窒素気流下で 70°C のオープン内で 1 時間乾燥させ、移動相溶媒であるアセトニトリルでカラム内を十分に洗浄して鋳型分子を除去し、MIP キャピラリーを作製した。また、鋳型分子を加えずに同様の操作で Non-MIP キャピラリーを作製した。MIP キャピラリーの性能は、インチューブ SPME 法により、選択性や濃縮効率から評価した。

### 4. 研究成果

(1) 分子インプリント法により、エストラジオールやカフェインを鋳型とした分子認識ポリマー (人工医薬品受容体) の合成法を検討し、その選択性や吸着能を評価した。フロロカーボン糸をキャピラリー内へ挿入して分子認識ポリマーをコーティングする新技術を考案し、異なる骨格を有する化合物にはほとんど選択性は認められず、類似構造を持つ化合物に対し選択性の高い分子認識能を示した。エストラジオール認識キャピラリーは、環境ホルモン作用の評価に有効である。

(2) SPME 法を用い、悪臭物質であるジオスミンやメチルボルネオールの環境水分析法を確立した。また、オンラインインチューブ SPME 法による PFOS や PFOA などの有機フッ素化合物の選択的濃縮法を確立し、環境分析に応用した。さらに、これまで困難であった水溶性化合物の効率的濃縮に機能性極性キャピラリーを用い、アミン類やアミノ酸類、ニコチンやコチニンの分析法を確立して、食品試料や生体試料分析に適用できることを明らかにした。

(3) オンラインインチューブ SPME/LC-MS 法を用いて、尿中ドーピング薬物や大麻代謝物の高感度迅速分析、パツリンやアフマトキシンの食品中かび毒 (マイコトキシン) の汚染分析、発がん性ベンゾ(a)ピレンなどの食品中多環芳香族炭化水素類のインチューブ SPME/HPLC-蛍光分析法を開発した。いずれの方法も、有機溶媒をほとんど必要とせず、オンラインで試料の抽出濃縮、自動分析が可能であり、実用的な方法として、生体試料や食品試料の分析に適用できることがわかった。

(4) ファイバー-SPME を用いて、皮膚から放出されるガスや滲出成分を効率よくサンプリング、抽出濃縮できる手法を開発し、GC-MS 法との連携で高感度選択的なアルコール及び体臭の簡易分析法を確立した。本法を用いれば、非侵襲的に生体成分をサンプリング可能であり、疾病診断への応用が期待される。

(5) CYP 酵素分子種の活性測定法を開発し、カプサイシンやクルクミンなどの香辛料成分に CYP 阻害効果が認められた。成分量と阻害効果による毒性を同時評価するために、キャピラリーへの酵素の固定化を検討したが、期待する効果はまだ得られていない。

以上より、機能性キャピラリーを用いるオンラインインチューブ SPME 法は、抽出濃縮効果と自動分析を可能にしたが、今後化合物濃度とその毒性効果も同時に測定できるようになるためには、さらなる改良と工夫が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Nonaka, Y., Saito K., Hanioka N., Narimatsu S., Kataoka H. (2009) Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216: 4416-4422. (査読有り)
2. Kataoka H., Itano M., Ishizaki A., Saito K. (2009) Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216: 3746-3750. (査読有り)
3. Kataoka H., Inoue R., Yagi K., Saito K. (2009) Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49 (1): 108-114. (査読有り)
4. Ohcho K., Saito K., Kataoka H. (2008) Automated Analysis of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Environmental Water by On-line In-tube Solid-phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-tandem

Mass Spectrometry. *J. Environ. Chem.*, 18 (4): 511-520. (査読有り)

5. 片岡洋行, 齋藤啓太 (2008) 食品における微量化学物質汚染分析のための試料前処理法: 固相マイクロ抽出及び関連マイクロ抽出法, *FFIジャーナル*, 213: 100-112. (査読有り)
6. Saito K., Okamura K., Kataoka H. (2008) Determination of musty odorants, 2-methylisoborneol and geosmin, in environmental water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1186: 434-437. (査読有り)
7. Kataoka H., Terada Y., Inoue R., Mitani K. (2007) Determination of isophoron in food samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1155: 100-104. (査読有り)
8. Mitani K., Fujioka M., Uchida A., Kataoka H. (2007) Analysis of abietic acid and dehydroabietic acid in food samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1146: 61-66. (査読有り)
9. Kataoka H., Matsuura E., Mitani K. (2007) Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44: 160-165. (査読有り)

[学会発表] (計 26 件)

1. 池田実希、薬物代謝酵素活性に対する調味料及び香辛料成分の影響、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 28、京都国際会議場 (京都市)
2. 齋藤啓太、ファイバー固相マイクロ抽出/GC-MS法による体臭原因物質の分析、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 27、京都国際会議場 (京都市)
3. 石崎厚、インチューブ固相マイクロ抽出/蛍光検出 HPLC 法による食品中の多環芳香族炭化水素類のオンライン自動分析、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 26、京都国際会議場 (京都市)
4. 野中結子、キャピラリー濃縮 LC-MS 法による食品中アフラトキシン類の高感度オンライン自動分析、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 26、京都国際会議場 (京都市)
5. 片岡洋行、高感度 LC-MS 法によるメラミン及び関連化合物の食品汚染分析、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 26 (京都市)

6. 横山敦志、インチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS/MS法による尿中の大麻代謝物の分析、日本薬学会第129年会、2009.3.26、京都国際会議場(京都市)
  7. 中西涼子、有機フッ素化合物PFOS及びPFOAとヒトシトクロムP450との相互作用、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008.11.9、岡山コンベンションセンター(岡山市)
  8. 池田実希、薬物代謝酵素活性に対する食品成分の影響、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008.11.9、岡山コンベンションセンター(岡山市)
  9. 武内友紀、ファイバー固相マイクロ抽出/GC-MS法による皮膚分泌成分分析、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008.11.8、岡山コンベンションセンター(岡山市)
  10. 八木克治、In-tube SPME/LC-MS法による筋肉増強禁止薬物のオンライン自動分析、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008.11.8、岡山コンベンションセンター(岡山市)
  11. 板野円香、In-tube SPME/LC-MS法による果汁飲料中パツリンのオンライン自動分析、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008.11.8、岡山コンベンションセンター(岡山市)
  12. 野中結子、In-tube SPME/LC-MS法によるアフラトキシン類の高感度オンライン自動分析、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008.11.8、岡山コンベンションセンター(岡山市)
  13. 石崎厚、In-tube SPME/蛍光検出HPLC法による多環芳香族炭化水素類の高感度オンライン自動分析、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008.11.8、岡山コンベンションセンター(岡山市)
  14. 齋藤啓太、SPME法による表皮サンプリング法の開発と生体成分分析への応用、日本分析化学会第57年会、2008.9.12、福岡大学(福岡市)
  15. 片岡洋行、インチューブSPME/LC-MS法によるカビ毒パツリンの高感度オンライン自動分析、日本分析化学会第57年会、2008.9.12、福岡大学(福岡市)
  16. 八木克治、インチューブSPME/LC-MS法によるドーピング薬物の高感度オンライン自動分析、日本分析化学会第57年会、2008.9.10、福岡大学(福岡市)
  17. 片岡洋行、タバコ煙曝露マーカーのオンラインインチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS分析、第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2008.8.21、札幌コンベンションセンター(札幌市)
  18. 片岡洋行、インチューブSPME/LC-MS法による尿中ニコチン及びニコチニンのオンライン自動分析、第69回分析化学討論会、2008.5.15、名古屋国際会議場(名古屋市)
  19. 齋藤啓太、インチューブSPME/LC-MS法による環境中PFOS及びPFOAのオンライン自動分析、第69回分析化学討論会、2008.5.15、名古屋国際会議場(名古屋市)
  20. 齋藤啓太、インチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS法による有機フッ素化合物の分析、日本薬学会第128年会、2008.3.28、パシフィコ横浜(横浜市)
  21. 野中結子、インチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS法による生理活性アミン類の分析、日本薬学会第128年会、2008.3.28、パシフィコ横浜(横浜市)
  22. 齋藤啓太、ファイバー固相マイクロ抽出/GC-MS法による環境中ジオスミン及び2-メチルイソボルネオールの分析、第46回日本薬学会中国四国支部学術大会、2007.11.10、高知市文化プラザ(高知市)
  23. 井上玲子、インチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS法によるニコチン及び関連化合物の分析、第46回日本薬学会中国四国支部学術大会、2007.11.10、高知市文化プラザ(高知市)
  24. 齋藤啓太、ファイバーSPME法による環境中のカビ臭の分析、日本分析化学会第56年会2007.9.21、徳島大学(徳島市)
  25. 片岡洋行、インチューブSPME法による水溶性化合物の濃縮分析、日本分析化学会第56年会2007.9.21、徳島大学(徳島市)
  26. 片岡洋行、固相マイクロ抽出/GC-MS法による室内空気汚染の発生源の分析、第68回分析化学討論会、2007.5.15、宇都宮大学(宇都宮市)
- [図書] (計 1 件)
- ① 片岡洋行、日本化学会編(丸善)「第5版 実験化学講座 20-1 巻 分析化学」2.2 節 試料のサンプリング・前処理 有機試料、(2007) pp. 51~77.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者 (2007~2008年度)  
片岡 洋行 (KATAOKA HIROYUKI)  
就実大学・薬学部・教授  
研究者番号：80127555
  - (2) 研究分担者 (2007年度)  
齋藤 啓太 (SAITO KEITA)  
就実大学・薬学部・助教  
研究者番号：30454854
  - (3) 連携研究者 (2008年度)  
齋藤 啓太 (SAITO KEITA)  
就実大学・薬学部・助教  
研究者番号：30454854